

人 APP 基因 C-末端片段在 PC12 细胞中的稳定表达 及其对细胞生长和发育的影响^①

乌永中, 马康涛, 张乃衡

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要: APP 在 AD 病因学中是一个重要的分子, 但到目前为止尚缺乏良好的动物和细胞模型用来探讨 APP 在 AD 发病中的作用。本研究旨在建立过表达人 APP 基因 C-末端片段的遗传工程细胞系。将人 APP₆₉₅ cDNA 中编码 C-末端 105 个氨基酸的片段重组到真核表达载体 pDORneo 中形成重组质粒 pDORneo-CT, 然后用脂质体将其转染到大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12)中。用 800 μ g/ml G418 筛选获得了在 mRNA 和蛋白质水平均表达相应片段的稳定细胞系。细胞形态学观察和 MTT, LDH 分析表明, 该片段在细胞内的表达未能对 NGF 处理的 PC12 细胞产生明显的毒性作用。

关键词: 反转录病毒表达载体; APP_{C105} 片段; PC12 细胞; 阿尔茨海默氏病

中图分类号: Q39 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9772(1999)05-009-13

The Stable Expression of Human APP Gene C-terminal Fragment in PC12 Cell Lines and Its Influence on the Growth and Development of Cells

WU Yong-zhong, MA Kang-tao, ZHANG Nai-heng

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China)

Abstract: The major obstacles to clarify molecular mechanisms involved in amyloid metabolism of Alzheimer's disease has been the unavailability of animal and cell models for this unique human disease. The present research was aimed at establishing genetically engineering cell lines that overexpress the C-terminal fragment of human APP gene. Cloned human APP cDNA and retrovirus eukaryocytic expressing vector pDoRneo were used to prepare for the transformed PC12 Cell lines. RT-PCR and Western Blot showed that stable transfectants which express the corresponding fragment of APP gene in mRNA and protein level have been obtained. Morphological observation and MTT, LDH assay showed that no apparent toxic effects have been observed.

Key words: Retrovirus vector; APP_{C105} fragment; PC12cell; Alzheimer's disease

阿尔茨海默氏病(Alzheimer Disease, AD)是继心脏病, 癌症, 中风之后引起人类死亡的重要疾病^[1]。其神经病理学特征是脑组织及脑血管上的老年斑沉积^[2~3]。 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)是老年斑的主要组分。A β 来源于其前体 APP(amyloid precursor protein)^[4]。目前许多证据表明, APP 基因的点突变、代谢异常及过表达所引起的 A β 的聚集, 是 AD 发病的重要原因之一^[5~6]。但到目前为止, 尚缺乏良好的动物及细胞模型用来阐明 APP 在 AD 发病中的作用。本研究旨在利用分子生物学及细胞生物学技术建立过量表达人 APP C-

①收稿日期: 1998-05-08; 修订日期: 1998-12-04

作者简介: 乌永中(1965-), 男, 博士学位, 专业方向: 生化及分子生物学。

末端片段的遗传工程细胞系。并探讨 *APP* 基因片段的表达产物对类神经细胞 PC12 细胞的作用, 为认识 AD 的发病机制及治疗打下基础。

1 材料和 方法

1.1 质粒、菌株、细胞株

pBbluescriptII ks-695 质粒含人 *APP* 基因 cDNA₆₉₅ 编码序列, 本室保存。pDORneo 带新霉素抗性基因的反转录病毒真核表达载体。由中国医学科学院肿瘤所程金科博士馈赠。pUC18 质粒, DH5 α 菌株, 本室保存。细胞株: 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12, 由中国医学科学院基础所蔡良婉教授馈赠。WO-2 鼠抗人 A β 1~16 单克隆抗体杂交瘤细胞, 本室保存。

1.2 试剂盒、酶、分子生物学试剂

细胞总 RNA 提取试剂盒为 GIBCO/BRL 公司的 Trizol 试剂盒, 反转录 PCR 试剂盒为 Promega 公司的 Access RT-PCR 试剂盒, 测序试剂盒为 Pharmacia 的 T7 Sequence 试剂盒。LDH 测定试剂盒购自德国 Centronic 公司。其它分子生物学试剂均购自 Promega、GIBCO/BRL、Pharmacia、华美、友谊、中山等公司。

1.3 表达载体的构建及筛选鉴定

利用 *Bgl*III, *Xmn*I 从质粒 pBbluescriptII ks-695 中切出编码人 *APP* 基因 C-末端 105 个氨基酸的 cDNA 片段(*APP*-CT), 将载体 pDORneo 先用 *Eco*RI 切开, 再用 Klenow 酶补平, 再用 *Bam*HI 切开, 将目的片段与载体片段用电洗脱法回收后, 定向连接后转化 DH5 α 形成重组体 pDORneo-APPCT, 详见图 1。酶切鉴定, 然后再将目的片段用 *Eco*RI、*Hind*III, 亚克隆到 pUC18 质粒, 利用 T7 测序试剂盒进行测序鉴定。

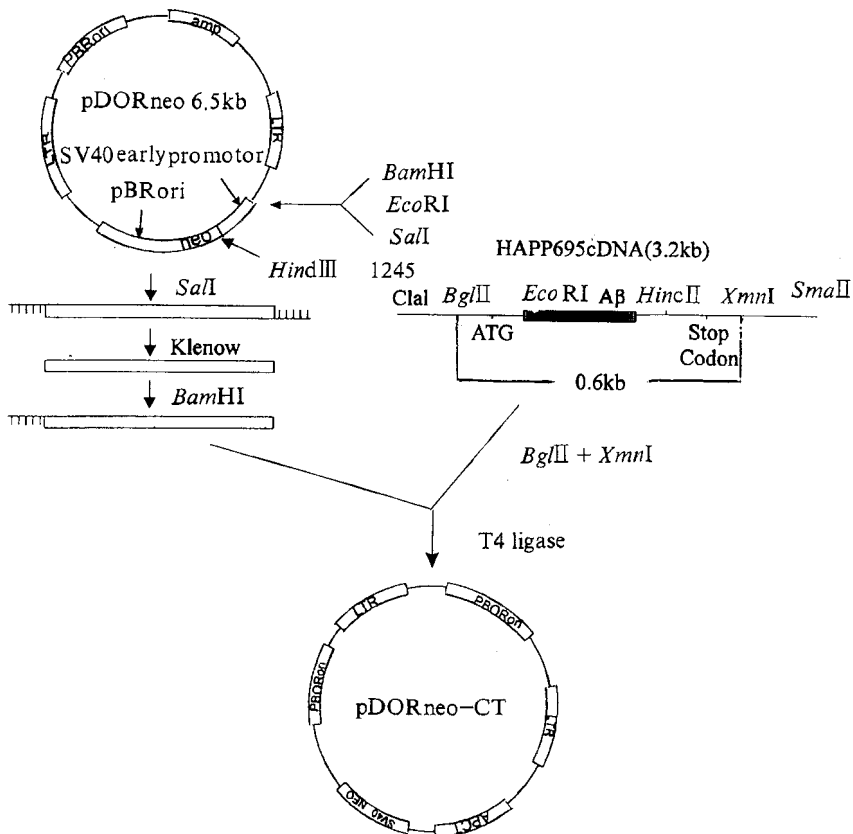


图 1 重组载体的构建

1.4 细胞培养和转染

PC12 细胞的培养条件为高糖 DMEM+10%胎马血清+5%胎牛血清+适量的双抗。用 Lipofectin Reagent 进行空载体及重组体的转染, 用适当浓度 G418 进行抗性克隆的筛选。

1.5 RT-PCR 方法检测转染细胞的 APPmRNA 的表达

以 Trizol 试剂盒按说明书进行细胞总 RNA 的提取, 然后用 RQ1 RNase-free DNase 除去残存的 DNA。用 Acces RT-PCR kit 进行 RT-PCR 反应, 引物为 K₁ 5'-(TTGGCCCCATGGATGCAGAATTCCGACAT)-3'及 K₂ 5'-(TTGGATCCCGAG TTCTTCATCTTCT)-3'。反应条件为 48℃ 反转录 45min, 94℃ 灭活反转录酶 2 min。扩增循环为 94℃ 30 s, 55℃ 30s, 72℃ 1 min。共进行 42 轮循环。然后取 10μl 扩增产物用 1%琼脂糖进行凝胶电泳与 1 kb DNA Ladder 比较。

1.6 Western Blot 方法检测细胞蛋白的表达

利用 Trizol 试剂盒进行全细胞蛋白提取, 用考马斯亮蓝 G250 染色法定量。取适量蛋白进行 Tris-Tricine SDS-PAGE 电泳, 将蛋白转移到硝酸纤维素膜上。用含 5%脱脂奶粉的 PBST 封闭, 用适当稀释度的 WO-2 抗体进行第一次杂交, 再用碱磷酶标记的鼠抗人抗体 IgG/AP 进行第二次杂交, 洗膜后加入生色底物 BCIP 和 NBT 显色。

1.7 MTT 法测量细胞的生长

细胞以 2×10^4 / 孔接种入 96 孔板, 每孔 100μl。按 50ng/ml 培养液加入 β-NGF, 每组设 4 孔, 培养液和 NGF 每两天更换一次。于接种后第 1、3、7 天利用 MTT 法测量细胞的生长情况。MTT 浓度为 0.5mg/ml, 37℃ 孵育 4 h, 弃去培养液, 加入 100μl / 孔 DMSO, 稍振荡待甲斐产物充分溶解后, 置酶标仪上测 OD₅₇₀。

1.8 细胞培养液和全细胞乳酸脱氢酶的测定

细胞复苏后用正常培养液培养 24 h 后, 改用 5%低血清培养液以减低血清中 LDH 对测定的影响。同时加入 50ng/ml 的 β-NGF。待细胞长满瓶后, 取 50μl 培养上清测定 LDH。然后按 100μl / 1ml 培养液加入 9%Tritonx-100 裂解细胞(37℃ 孵育 4 h), 离心取 50μl 上清用于全细胞 LDH 的测定。

$$\text{LDH 释放} = \text{上清中 LDH} / \text{上清中 LDH} + \text{细胞内 LDH}$$

2 结 果

2.1 载体构建(图 1)

利用 EcoRI, HindIII 从重组载体上切出了与预计相符的 0.9kb 的片段, 利用 HincII, HinfI 切出 0.6kb 的片段, 酶切图谱见图 2, 对亚克隆到 pUC18 上的目的片段测序结果表明插入片段序列与已知序列吻合。

2.2 细胞转染及 G418 抗性克隆的筛选

用 Lipofectin 对 PC12 细胞进行转染, G418 的剂量从 200μg/ml 开始, 每 3 天递增 200μg/ml, 在两周内升到 800μg/ml 维持此浓度直到单克隆形成。对 G418 抗性克隆进行扩增, 提取 RNA 及蛋白质并进行鉴定。

2.3 RT-PCR 方法检测转染细胞 APP 基因 mRNA 的表达

由于野生型 PC12 细胞也表达 APP 基因, 故首先进行了不同稀释度的细胞总 RNA 的 RT-PCR 分析, 以找出 APP 的最低检出量。结果表明在 1ng 总 RNA 的条件下即可扩增出明显的条带。在对转染细胞进行 RT-PCR 鉴定时, 选择了 100pg 的总 RNA 样品进行扩增, 结果野生型及空载体转染的细胞未扩增出目的条带, 而 pDORneo-CT 转染的细胞可以扩增出预计条带(图 3)。

2.4 Western 印迹方法检测转染细胞中蛋白的表达

对上述 RT-PCR 鉴定有 APP mRNA 表达的几株转染细胞进行 Western 印迹检测, 结果表明在转染的细胞中在分子量 16kD 处有明显的条带, 而野生型及 pDORneo 空载体转染的细胞在相应部位无条带出现。

2.5 细胞生长发育及乳酸脱氢酶的释放

由表 1 可见, 与野生型及 pDORneo 空载体转化的 PC12 细胞相比 APP-CT 转化的 PC12 细胞生长发育速度

及 LDH 的释放未见明显的不同。

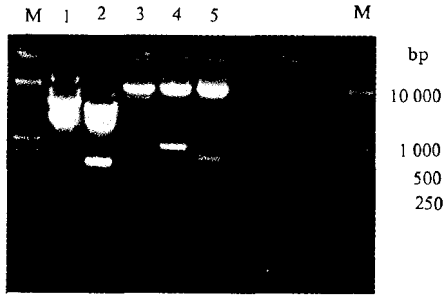


图2 重组体酶切鉴定图

M. 1 kb DNA 标准物; 1. pBbluescriptII ks-695 *EcoRI*; 2. pBbluescriptII ks-695 *BglII*, *XmnI*; 3. pDoRneo *EcoRI*, *HindIII*; 4. pDoRneo-CT *EcoRI*, *HindIII*; 5. pDoRneo-CT *HincII*, *HindIII*.

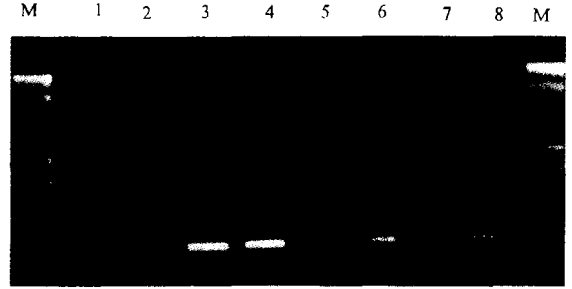


图3 APP RNA 在转化的 PC12 细胞内的表达

M. 1 kb DNA 标准物; 1. 阴性对照, RT-PCR 反应中未加反转录酶; 2. pDoRneo 空载体转化的 PC12 细胞; 3~8. pDoRneo-CT 转化的 PC12 细胞。

表1 PC12 细胞 MTT 和 LDH 的释放

项目	天数	野生型 PC12	空载体转化的 PC12	APP-CT 转化的 PC12
LDH efflux	7	11.98	10.81	11.32
MTT	1	0.330	0.325	0.320
	3	0.356	0.365	0.363
	7	0.435	0.439	0.420

以上 LDH 为 3 组平均值, MTT 为 4 组平均值。

3 讨 论

Yankner 1989 年利用 DO-载体获得了稳定表达人 APP 基因 C-末端 105 个氨基酸的 PC12 细胞系。并发现转化细胞当用神经生长因子刺激后第三天细胞不再正常分化, 第八天基本死亡。而野生型 PC12 细胞及空载体转化的 PC12 细胞正常发育。认为此系 APP 基因 C-末端表达产物对类神经的 PC12 细胞的毒性所致⁽⁷⁾。Faheem A. Sandhu 等 1996 年利用带有 SV40 病毒和 JC 病毒启动子的载体也获得了稳定表达 APP 基因 C-末端片段的 PC12 细胞, 但未观察到该基因的表达产物对 NGF 诱导分化的 PC12 细胞的毒性作用, 他们发现, 与野生型及空载体转化的 PC12 细胞相比, APP 基因 C-末端表达的 PC12 细胞对生长因子的反应出现了异常。即 NGF 不能诱导转化的 PC12 细胞向神经细胞分化, 而 bFGF(basic fibroblast growth factor, bFGF)却可促进其分化⁽⁹⁾。我们利用了和 Yankner 相似的载体和目的基因片段, RT-PCR 和 Western 印迹显示转化细胞在 RNA 和蛋白质水平均表达了目的基因相应的片段, 但形态观察表明, APP C-末端转化的 PC12 细胞同野生型及 pDORneo 空载体转化的 PC12 细胞相比, 当用 NGF 刺激后没有明显的形态上的差异。NGF 均可促进其向神经细胞分化, 表现为出现明显的神经突触, 但细胞之间并未形成广泛的突触联系, 也未出现明显的细胞死亡。MTT、LDH 分析表明, 细胞之间的生长发育速度也未受到明显的抑制。越来越多的证据表明 A β 表达的量及其聚集状态是决定其对神经细胞毒性作用的关键因素, 低浓度可溶性 A β 对神经细胞有营养作用, 而高浓度聚集的 A β 则有神经毒性作用⁽¹⁰⁾。Yankner 在 APP-CT 转化的细胞上清中检测到了聚集的 A β 的存在⁽⁷⁾, 而本实验未能在 APP-CT 转化的细胞上清中检测到聚集的 A β 的存在。故也未观察到其对细胞的毒性作用。另外 A β 对细胞的毒性作用与细胞的分化状态密切相关。对低分化的神经细胞有营养性作用, 而对高度分化的神经细胞则有神经毒性作用⁽¹⁰⁾。我们使用的 PC12 细胞是高传代的 PC12 细胞, 据 Baetge 报道, PC12 细胞较易突变⁽¹¹⁾。本研究所用的 PC12 细胞, 当用 NGF 刺激后未能观察到 Yankner 所报道的细胞之间形成广泛的突触联系, 即细胞未能完全

分化为成熟的神经细胞。因此, 我们未能观察到 APP-CT 的毒性作用。APP 代谢产生 A β 的途径是目前 AD 研究的热点和难点所在。APP 如何由组成型非 A β 产生途径向选择型 A β 产生途径的转变对认识 AD 的病因学将是一个重要的环节。Yankner 等认为, APP-CT 在细胞内的过表达可能改变了 APP 的正常代谢途径, 结果导致过量 A β 的产生。细胞转染实验表明, APP 基因的突变可引起 A β 产量的增加和易聚集的 A β_{1-42} 比例的增加^[13]。Boyu Zhao 等认为外源 APP 基因在细胞内的高水平表达也许超过细胞正常代谢 APP 的能力从而形成潜在的淀粉样蛋白生成片段。但细胞处理 APP 的差别主要取决于 APP 基因的突变, 而非简单的过表达所致^[14]。我们在对 APP-CT 转化的细胞进行 Western 印迹分析时发现同野生型及空载体转化的细胞相比, APP-CT 转化的细胞溶解物内只是比对照组多了一个分子量约 16kDa 的目的条带, 未见有其它异常的条带。表明单纯的 APP-CT 表达不一定能改变 APP 的代谢途径。另外细胞的毒性与 APP-CT 蛋白的细胞内外定位有关。Michael R. Kozlowski 等发现 APP-CT 蛋白对细胞的神经毒性需要该蛋白释放到细胞外, 然后以 pH 值依赖的方式与细胞膜上的专一性受体结合^[15]。我们在表达 APP-CT 时未用信号肽序列, 因此, 未能在转化的细胞上清中检测到 APP-CT 蛋白的存在。Bryce L. Sopher 利用免疫沉淀法检测了 APP-CT 转化的 SK-N-MC 细胞培养上清中 A β 及 APP-CT 蛋白的表达情况, 无论用抗 C-末端抗体(6561), 还是抗 A β N-端抗体(6C6)均未检测到上清中 APP-CT 蛋白的存在, 与本实验结果一致。综上可知, APP 基因 C-末端片段在细胞内的表达是否对细胞产生毒性作用与其在细胞内的表达量及细胞内外的定位有关, 同时也与细胞的生长分化状态有关。

参 考 文 献:

- (1) Dresse A, et al. Towards a pharmacological approach of Alzheimer's disease based on the molecular biology of the amyloid precursor protein (APP)[J]. Life Science, 1994, 55(25/26): 2179~2187.
- (2) Smith C, Anderton B H. The molecular pathology of Alzheimer's disease: are we any closer to understanding the neurodegenerative process[J]? Neuropathology and Applied Neurobiology, 1994, 20: 322~338.
- (3) Selkoe D J. Cell biology of the amyloid β -protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease[J]. Ann. Rev. Cell Biol. 1994, 10: 373~403.
- (4) Selkoe D J, et al. β -amyloid precursor protein of Alzheimer's disease occurs as 110-135 kilodalton membrane-associated proteins in neuronal and nonneuronal tissues[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85: 7341~7345.
- (5) Hendriks L, Broeckhoven C V. The β A4 amyloid precursor protein gene and Alzheimer's disease[J]. Eur. J. Biochem., 1996, 237: 6~15.
- (6) Selkoe D J. Alzheimer's disease: genotype, phenotype, and treatments[J]. Science, 1988, 275: 630~631.
- (7) Yankner B A, et al. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease[J]. Science, 1989, 245: 417~420.
- (8) Majocha R E, et al. PC12 cells release stimulatory factors after transfection with β /A4-C-terminal DNA of the Alzheimer amyloid precursor protein[J]. Molecular and Chemical Neuropathology, 1993, 18: 99~110.
- (9) Sandhu F A, et al. Expression of the C-terminus of the amyloid precursor protein alters growth factor responsiveness in stably transfected PC12 cells[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93: 2180~2185.
- (10) Yanker B A, et al. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides[J]. Science, 1990, 250: 279~281.
- (11) Baetge E E, et al. Neurite outgrowth in PC12 cells deficient in GAP-43[J]. Neuron, 1991, 6: 21~30.
- (12) Murrell J et al. Mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease[J]. Science, 1991, 254: 97~99.
- (13) Tamaoka A, et al. APP717 missense mutation (Val to Ile)selectively increase the amyloidogenic longer form of amyloid β -protein (A β_{1-41} /43) in brain with familial Alzheimer's disease[J]. J. Biol. Chem., 1994a, 269: 32721~32724.
- (14) Zhao B, et al. Altered processing of a mutant amyloid precursor protein in neuronal and endothelial cells[J]. J. Neurosci. Res., 1995, 40: 261~268.
- (15) Michael R, Kozlowski, et al. The neurotoxic carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor binds specifically to a neuronal cell surface molecule: pH dependence of the neurotoxicity and binding[J]. J. Neurosci., 1992, 12 (5): 1679~1687.